

## Patent

1/26/01

(10/00)

#8

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年 7月 2日

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第189211号

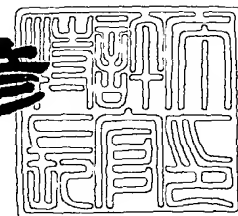
出 願 人  
Applicant (s):

アイシン精機株式会社

2000年 6月29日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3052449

【書類名】 特許願

【整理番号】 9907003

【提出日】 平成11年 7月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県刈谷市朝日町 2 丁目 1 番地 アイシン精機株式会社  
社内

    【氏名】 重森 康司

【特許出願人】

    【識別番号】 000000011

    【氏名又は名称】 アイシン精機株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100060782

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094293

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【選任した代理人】

    【識別番号】 100103311

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小田嶋 平吾

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 019666

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

特平 1 1 - 1 8 9 2 1 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【ブルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二本鎖DNA断片の末端での連結

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一本鎖部（s s 部）末端を有する二本鎖DNAのs s 部末端と、一方の鎖が前記s s 部の塩基配列に対して相同性の配列を含む二本鎖部（d s 部）末端を有する二本鎖DNAのd s 部末端とを、相同的組換えタンパク質の存在下で接触させて前記s s 部末端とd s 部末端とを含んでなる三本鎖DNA構造の複合体を形成することを特徴とする二本鎖DNAのs s 部末端とd s 部末端との連結方法。

【請求項2】 s s 部末端を両端に有する二本鎖DNA断片と、一方の鎖に前記s s 部の塩基配列に対して、それぞれ相同性の配列を含むd s 部末端を両端に有する二本鎖DNA断片、またはs s 部末端およびd s 部末端を有する二本鎖DNA断片と、一方の鎖に前記s s 部の塩基配列に対して相同性の配列を含むd s 部末端および前記d s 部の一方の鎖の塩基配列に対して相同性の配列を含むs s 部末端を有する二本鎖DNA断片とを連結し、二箇所三本鎖構造を有する環状のDNA複合体を形成する請求項1記載の連結方法。

【請求項3】 2つのs s 部の塩基配列が相互に非相補性である請求項2記載の連結方法。

【請求項4】 2つのs s 部末端が同一の二本鎖DNA断片中に存在する請求項2または3に記載の連結方法。

【請求項5】 DNA断片の一つがコンピテント細胞内で自律複製できる機能を提供しうるDNA断片である請求項2～4のいずれかに記載の連結方法。

【請求項6】 DNA断片のもう一つがクローニングすべき遺伝子の一部または全部を含んでなる請求項5記載の連結方法。

【請求項7】 s s 部の塩基配列が少なくとも6merである請求項1～6のいずれかに記載の連結方法。

【請求項8】 相同的組換えタンパク質がRecAタンパク質およびRecAタンパク質に類似する機能を有するタンパク質からなる群より選ばれる請求項1～7のいずれかに記載の連結方法。

【請求項 9】 接触が、さらにヌクレオシド三リン酸またはその誘導体の存在下で行われる請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0】 形成される二箇所に三本鎖構造を有する環状 DNA 複合体を、さらにコンピテント細胞内に導入し、こうして得られた形質転換体を培養して三本鎖構造部分が二本鎖構造に変換した環状 DNA を形成する請求項 2 ～ 9 のいずれかに記載の連結方法。

【請求項 1 1】 形成される二箇所に三本鎖構造を有する環状 DNA 複合体を、予めエンドヌクレアーゼで処理することにより三本鎖構造部分を二本鎖構造に変換した後、さらにコンピテント細胞に導入し、こうして得られた形質転換体を培養して、環状 DNA を増幅する請求項 2 ～ 9 のいずれかに記載の連結方法。

【請求項 1 2】 環状 DNA 構成体であって、一本鎖部 (s s 部) 末端と一方の鎖が前記 s s 部の塩基配列に対して相同性の配列を含む二本鎖部 (d s 部) 末端とからなる三本鎖構造部分を少なくとも一箇所有する DNA 構成体。

【請求項 1 3】 三本鎖構造部分を二箇所有し、これらの構造部分を形成する s s 部の塩基配列が相互に非相同性のものである請求項 1 2 記載の DNA 構成体。

【請求項 1 4】 各 s s 部の塩基配列が少なくとも 6 m e r である請求項 1 2 または 1 3 記載の DNA 構成体。

【請求項 1 5】 三本鎖構造部分が相同組換えタンパク質との複合体を形成している請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれかに記載の DNA 構成体。

【請求項 1 6】 二つの三本鎖構造部分に挟まれた一方の二本鎖 DNA セグメントがコンピテント細胞内で自律複製できる機能を提供しうるものであり、もう一方の二本鎖 DNA セグメントがクローニングすべき遺伝子の一部または全部を含むものである請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれかに記載の DNA 構成体。

【請求項 1 7】 (A) 一本鎖部 (s s 部) を両末端に有する二本鎖 DNA 断片であって、これらの s s 部における塩基配列が相互に非相補性であり、かつ二本鎖部にコンピテント細胞内で自律複製できる機能を提供しうる DNA 配列が存在する DNA 断片と、

(B) 上記各 s s 部の塩基配列に相同性の配列をそれぞれ 5' 末端の一部と

して有し、それぞれさらに、クローニングすべき遺伝子の片末端の配列の一部と  
もう一方の片末端の配列の一部を連続した配列として有する2種のオリゴヌク  
レオチドのプライマーとの組み合わせ物を含んでなる遺伝子のクローニング用キ  
ット。

【請求項18】 各ss部における塩基配列が少なくとも6merである請  
求項17記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子操作に関し、より具体的にはDNAの連結方法、該連結方法  
で得ることのできる環状DNA構成体および遺伝子のクローニング用キットに関  
する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子操作においては、遺伝子を所望する部位で切断する方法および各遺伝子  
(またはDNA)断片を選択的に連結する方法が必須である。前者の典型的なも  
のとしては、所望する部位の近傍に制限酵素の認識する部位が存在する場合には  
、対応する制限酵素で切断し、必要に応じて、さらにエキソヌクレアーゼを用い  
てさらにモノヌクレオチドを順次切断していく方法が知られる。

【0003】

一方、後者における特定部位間の連結方法としては、適当な場合には制限酵素  
によるDNA切断フラグメントの付着末端を利用するか、あるいはDNAの平滑  
、末端をそのまま、もしくは該平滑末端に適当なアダプターを付加した末端を利  
用し、DNAリガーゼを用いて連結する方法が知られている。

【0004】

付着末端を利用する方法は標的のDNA断片に対応する制限酵素部位が存在し  
なければ適用できず、また平滑末端を利用する方法は連結の方向性が特定できな  
いために、目的の連結体を他の連結体から分離する操作等を必要とする。

【0005】

アダプターを利用する方法は、連結しようとするDNAの塩基配列の種類により制限されることなく適用できるが、例えば、アダプターのライゲーション、未反応アダプターの除去、リン酸化等の多段操作を必要とするため、操作が煩雑であり、また操作に熟練が要求される。殊に、PCR産物から目的の遺伝子のみをクローニングする場合、PCRの性質上、目的とするPCR産物に混在する副産物の処理が必要となり、上記操作がより複雑になる。勿論、PCRにより得られた平滑末端を有するDNAをそのままライゲーションに供することもできるが、この場合には、上記副産物の処理の必要性に加えて、上述のようにライゲーションの方向性がランダムになるとの問題も生じる。

## 【0006】

C. Aslanidis ら、Nucleic Acids Research, Vol.18 (1990), 6069-6073には、制限酵素やDNAリガーゼを使用することなく、特有の反復配列を有するプライマーを用いて増幅されたPCR産物と同様に増幅されたプラスミドベクターを、それぞれ特殊の方法で一本鎖化(ss)されたテイルを介して二分子会合体(環状)を形成し、次いで該会合体を細菌に導入し、次いで環状体のみを選択的に取得する方法が提案されている。しかし、この方法は、特有の反復配列を有するベクターDNAおよび対応する配列を有するPCRプライマーの使用、さらにPCR後の酵素によるPCR産物の末端の一本鎖化が必要であり、必ずしも汎用性のある方法とはいえない。

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、適当な制限酵素部位の存在を必要とせず、簡易に操作でき、しかも汎用性のあるDNA断片の連結方法を提供することにある。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、生体内でのDNAの相同組換えに興味をもち、研究してきた。その結果、生体外でRecAタンパク質を介して形成されるDNA複合体が多方面に利用できることを見出した。本発明は、その一環として、二本鎖DNA断片における一本鎖(ss)部末端と該ss部末端に相同性もしくは相補性の末端配列



を有する二本鎖（ds）部末端とが、RecAタンパク質の作用下で三本鎖部を形成して安定な連結体をもたらすことおよびその広範な適用性が存在するとの知見に基づき完成されたものである。

【0009】

したがって、本発明は、一本鎖部（ss部）末端を有する二本鎖DNAのss部末端と、一方の鎖が前記ss部の塩基配列に対して相同性の配列を含む二本鎖部（ds部）末端を有する二本鎖DNAのds部末端とを、相同的組換えタンパク質の存在下で接触させて前記ss部末端とds部末端とを含んでなる三本鎖DNA構造の複合体を形成することを特徴とする二本鎖DNAのss部末端とds部末端との連結方法に関する。

【0010】

また、本発明は、かような連結方法によって形成することのできる特定の環状DNA構成体が一定の生体外の環境下で安定に存在しうるとの知見に基づき提供される、環状DNA構成体であって、一本鎖部（ss部）末端と一方の鎖が前記ss部の塩基配列に対して相同性の配列を含む二本鎖部（ds部）末端とからなる三本鎖構造部分を少なくとも一箇所有するDNA構成体に関する。

【0011】

また、本発明は、上記連結方法、さらには上記環状DNA構成体の形成を介する手段が、所望の遺伝子、殊にPCR産物のクローニングに適していることから、そのようなクローニングに用いられるキットにも関する。

【0012】

【発明の具体的な態様】

本発明にいう「相同性」は、2種の一本鎖DNA間における広義の配列相同性に相当し、本発明に従って、例えば、後述する三本鎖構造を形成するのに十分な配列の同一性を意味する。したがって、2種の一本鎖DNA間の塩基配列が完全に一致することまで要求するものでなく、好ましくは95%以上の同一であればよく、また2種の一本鎖DNA配列間で鎖長が若干異なる場合も本発明にいう相同性があるとされる。また、「相補性」とは、2種の一本鎖DNA間で相互に塩基対を形成するか、あるいはストリンジェントな条件下でハイブリダイゼン

を起こしうる関係にあることを意味する。したがって、相補性は、両DNA配列間で、少なくとも95%以上が本来の塩基対を形成できるような関係にあることを意味し、また2種の一本鎖DNA配列間で鎖長が若干異なる場合も相補性があるとされる。

#### 【0013】

本発明によれば、一本鎖部（ss部）末端を有する二本鎖DNAのss部末端と、一方の鎖が前記ss部の塩基配列に対して相同性の配列（したがって、もう一方の鎖は該塩基配列に対して相補性である）を有する二本鎖部（ds部）末端を有する二本鎖DNAのds部末端との連結方法が提供される。この連結は直鎖状DNA分子において1箇所または、複数部位で同時にもしくは連続して起こることも想定されているが、2箇所で行われる場合が好ましい。1個または複数のDNA断片の各末端において、1箇所または複数箇所で行われる連結の結果、環状または直鎖状のDNA連結体が形成される。限定されるものでないが、好ましくは、環状DNA連結体が形成される場合が、特に好ましいものとして企図されている。DNA連結体は、明細書では、DNA構成体またはDNA組換え体とも称されるが、1個の二本鎖DNA断片または複数の二本鎖DNA断片から構築されるものを意味する。

#### 【0014】

本発明に従う「連結」は、これに拘束されるものでないが、典型的には図1に略図的に示されているような様式で起こる。図1によれば、DNA断片1とDNA断片2の二本鎖部（ds部）末端と一本鎖部（ss部）末端との間の連結が示されているが、これらのds部末端とss部末端は、同一または2種以上のDNA分子上に存在してもよい。同一の分子（すなわち、DNA断片1とDNA断片2が一つの断片となる）上にds部末端とss部末端が存在する場合には、連結の結果として環状DNA構成体が形成し、三本鎖構造部分は1箇所になる。

#### 【0015】

2種以上のDNA分子（または断片）にss部末端および／またはds部末端が存在する場合には、図1に示されるように、（i） DNA断片1においてds部末端が、そしてDNA断片2においてss部末端がそれぞれ1個ずつ存在す

るか、(i i) DNA断片1の5'末端と3'末端の両末端にd s部末端がそれぞれ存在し、そしてDNA断片2の5'末端と3'末端の両末端にs s部末端がそれぞれ存在するか、あるいは(i i i)または(i v) DNA断片1の5'末端もしくは3'末端にd s部末端が存在し、3'末端もしくは5'末端にs s部末端が存在し、そしてDNA断片2の3'末端もしくは5'末端にs s部末端が存在し、5'末端もしくは3'末端にd s部末端が存在しうる。本発明によれば、以上のDNA断片1とDNA断片2とが逆の関係にある場合、さらに1種以上の追加のDNA断片がそれらの両末端または片末端にd s部および/またはs s部を有する場合の連結も包含される。

## 【0016】

好ましいものとしては、上記(i i)～(i v)に記載したような、2種のDNA断片間の連結を挙げることができる。この場合、DNA断片1および/またはDNA断片2に存在する2つのd s部末端は同一または異なる塩基配列をもつことができ、同様に2つのs s部末端は前記d s部末端にそれぞれ対応する同一または異なる塩基配列をもつことができる。「それぞれ対応する」とは、連結されるべきd s部末端とs s部末端とが、本発明に従って三本鎖構造を形成できる関係にあることを意味する。すなわち、連結されるべきd s部末端におけるセンス鎖（例えば、図1の二本鎖DNA断片の上部の一本鎖DNAに相当する鎖を本明細書では便宜的に、このように称する。また、もう一方の下部の鎖は、アンチセンス鎖と称する）の塩基配列と、s s部末端のセンス鎖（上記と同様の意味を表すものとして用いている）の塩基配列が相同性であることを意味する。「相同性」については、上記定義を参照されたい。

## 【0017】

本発明に従えば、上記2つのs s部末端は、異なる塩基配列、殊に相互に相補性でないことが好ましい。このような構成を採用すれば、2つのs s部末端間で起こる結合を避けることができ、各s s部末端はそれらの対応する各d s部末端と三本鎖構造を形成するために優先して利用されうる。2つのs s部末端は、特に、後述する遺伝子のクローニング等に本発明を適用する場合には、それぞれ同一のDNA断片の5'および3'末端を構成していることが好ましく、また、s

s 部末端は、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれに存在してもよいが、同一の DNA 断片における、センス鎖の 3' 末端もしくは 5' 末端とアンチセンス鎖の 3' もしくは 5' 末端に、それぞれ s s 部末端をもつことが好ましい。

【0018】

上記 s s 部末端の塩配列の長さは、限定されるものでないが、少なくとも 6 m e r の、好ましくは 1 3 m e r 以上からなる。6 m e r 未満の場合、本発明に従う連結を達成するのに必要な三本鎖構造が安定性を欠く場合がある。上記長さには、理論上、上限はないが、一般的に 5 0 0 m e r (または b a s e) 以下、好ましくは 1 0 0 m e r 以下である。

【0019】

本発明の方法に適用される DNA 断片は、それらの起源を問うことなく、いずれの DNA 断片であってもよい。しかし、例えば、2 種の断片を連結させる場合、一方は、適当なコンピテント細胞内に導入でき、そして該細胞内で自律複製できるベクターに由来するものが好ましい。このようなベクターは、その後連結体が導入させるコンピテント細胞によって選ばれるが、該細胞として大腸菌を使用する場合には、市販されている、p B R 3 2 2、p U C 系 (例えば、p U C 1 8、p S P 6 4、p G E M - 3、p B l u e s c r i p t)、等のベクターまたはプラスミドを挙げることができる。また、該細胞として酵母を使用する場合には、Y E p 2 4、Y L p 5 等の、さらにバチルスを使用する場合には p H Y 3 0 0、P L K 等のベクターまたはプラスミドを挙げることができる。

【0020】

他方、もう一方の DNA 断片としては、微生物、または動植物のゲノムもしくはミトコンドリア等に由来する断片を、特に企図しているが、合成もしくは半合成 DNA、すでに遺伝子操作が施された DNA 等に由来するものであってもよい。

【0021】

本発明の方法を、例えば、遺伝子のクローニングに使用する場合には、目的とする遺伝子またはその一部を含む断片の両 d s 部末端における塩基配列に対応する配列をもつ s s 部末端が上記ベクターに由来する DNA 断片の両末端にそれぞれ

れ結合された態様のものを、一方のDNA断片として選ぶ。上記両ds部末端は、生来の遺伝子が有する塩基配列そのものであってもよいが、例えば、上記ss部末端の一部または全部に対応する塩基配列を有するように調製されたものであってもよい。このように調製されたものとしては、例えば、2つのss部末端配列に続けて目的とする遺伝子の5'もしくは3'末端部の塩基配列をそれぞれ有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR産物が挙げられる。

## 【0022】

上記のDNA断片は、本発明の目的に沿い、そして本発明の作用効果を奏するものである限り、それらの鎖長に制限がない。当業者であれば、本明細書の記載全体または後述する実施例を参照すれば、あるいは該実施例に沿って実験を行うことで、上記鎖長の適当な範囲を理解できるであろう。

## 【0023】

本発明では、上記のds部末端とss部末端を、適当な液体媒質中の相同的組換えタンパク質の存在下で接触させる。かような相同的組換えタンパク質（または普遍的組換えに関与する多機能性タンパク質）としては、その存在下で上記ds部末端と上記ss部末端が、該タンパク質を介して安定な複合体を形成しうるものであれば、起源を問うことなく、いかなるタンパク質も使用できる。しかし、かようなタンパク質の具体的なものとしては、大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来するRecAタンパク質、耐熱性細菌 (*Thermus thermophilus*)、他の腸内細菌において、RecA遺伝子によりコードされている多機能性タンパク質、また、アグロバクテリウム ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、メチロフィルス メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ウスティラゴ メイディス (*Ustilago maydis*) 等に由来する、それ自体既知のRecA類似タンパク質が挙げられる。その他、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やヒトに由来するRecA類似タンパク質も、上記相同的組換えタンパク質に包含される。これらのうち、入手容易性、安定性、機能性の観点から、大腸菌に由来するRecAタンパク質またはそれに類似する機能を有するタンパク質（例えば、該タンパク質に由来する改変タンパク質もしくはその断片）を使用することが好ましい。改

変タンパク質としては、RecA遺伝子の部位特異的変異誘発等により作出されたRecA遺伝子産物であって、RecAタンパク質において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつRecAタンパク質と同様に上記三重鎖DNA部分を有する複合体を形成しうる機能を有するものを挙げることができる。数個のアミノ酸が欠失したものには、RecAタンパク質の一本鎖DNAへの結合ドメインを含むタンパク質もしくはペプチドが包含される。このようなペプチドの例としては、Voloshin et al., Science, Vol. 272, 1996: 868-872に記載されているものを挙げるができる。なお、以上より理解できるように、本発明にいうタンパク質の語は、ペプチドをも包含する概念で使用している。

【0024】

また、上記接触に際し、ヌクレオシド三リン酸を共存させることが好ましいか、もしくは必要である。このようなヌクレオシド三リン酸としては、アデノシン5'-三リン酸(ATP)またはその類縁体、例えばアデノシン( $\gamma$ -チオ)-三リン酸(ATP- $\gamma$ S)、あるいはdATP、UTP、dUTP、CTP、dCTPまたはGTPなどを挙げるができる。なお、上記複合体を形成する系において、例えば、ATPが生物学的な分解を伴うような場合には、ATP- $\gamma$ Sを使用するのが好ましい。

【0025】

上記接触は、適当な液体媒質、例えば、適当な緩衝剤によって緩衝化されていてもよい水溶液中で行う。緩衝剤を使用する場合は、例えばトリス[すなわち、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン]と適当な酸(例えば酢酸、塩酸、等)とによりpHを6.5~7.5、好ましくは約7.2に調節したトリス系の緩衝液を使用する。緩衝剤は一般に10mM~50mM、好ましくは約30mMで使用する。このような液体媒質中に、連結されるべき上記のDNA断片を溶解し、さらには相同的組換えタンパク質およびヌクレオシド三リン酸を加えて得られる混合液をインキュベートすることにより、上記接触が行われる。

【0026】

連結されるべきDNA断片は、それぞれの末端が適正に連結するのに悪影響が

生じない範囲であれば、それらの使用割合はいずれであってもよい。しかし、本発明の方法が特定の遺伝子のクローニングに使用される場合には、遺伝子の全部またはその一部を含む断片に対し、連結すべきもう一方の断片をほぼ等モルで使用するのが好ましい。また、相同的組換えタンパク質の使用割合は、ss部の鎖長に依存して変動するので限定できないが、一般的にss部を構成するヌクレオチド数を上回るモル量で、好ましくはヌクレオチド3個に対してほぼ1モル量とするのがよい。

## 【0027】

さらに、上記のように調製される混合液は、4～54℃、好ましくは約37℃において15分以上、一般的に約30分間インキュベートすることにより、本発明にいう「接触」を完了することができ、その結果、三本鎖構造部分を少なくとも1箇所所有するDNA断片の連結体（またはDNA構成体）が形成される。

## 【0028】

こうして形成されるDNA構成体は、通常、少なくとも三本鎖構造部分に相同的組換えタンパク質が結合した複合体の形態で存在する。このような複合体は、適当な精製法、例えば、フェノール・クロロホルム抽出、ゲル濾過法、各種電気泳動法等により反応混合液から分離することができる。こうして分離された複合体は、生体外の通常の生理学的な条件下で安定であり、複合体を構成するDNA配列または遺伝子の解析に利用できる。

## 【0029】

また、上記複合体は、その形成された反応混合液から分離することなく（もしくは場合によって分離して）、プロティナーゼ（例えば、プロティナーゼK）で処理することにより、相同的組換えタンパク質を複合体から除去することができる。こうして、除タンパク質処理されたDNA構成体も、安定である。特に、2種のDNA断片の連結により形成され、2箇所に三本鎖構造を有するものは、特に安定であり、しかも、常法によりコンピテント細胞へ効率よく導入できる。なお、導入に先立って、一本鎖核酸に特異的に作用するエンドヌクレアーゼにより三本鎖構造部分（図1参照）を、二本鎖構造に変換したDNA構成体とすると、さらにコンピテント細胞への導入効率を高めることができる。

## 【0030】

この導入は、DNA断片の一方に使用するベクター由来の断片の出発原料（ベクター）の種類により、適当に選ぶことができるが、例えば、コンピテント細胞として大腸菌を選び、そしてベクターまたはプラスミドとして大腸菌で自律複製できるベクターを選ぶ場合には、エレクトロポレーション法、カルシウム処理法などにより実施できる。こうして上記DNA構成体が導入された細胞を培養すれば、上記三本鎖構造部分（存在する場合には）が二本鎖構造部分（この構造部分は、上記ds部末端からss部末端に相当するヌクレオチド配列が除去された状態で、ds部末端とss部末端がリン酸ジエステル結合を介して共有結合しているものと推定される）に変換した環状DNA構成体を増幅することができる。

## 【0031】

上記のコンピテント細胞への遺伝子導入の常法に従えば、環状DNA構成体が直鎖状DNA構成体に比し、著しく高い効率でコンピテント細胞に導入されうる。したがって、例えば、2種のss部末端の塩基配列に対応する配列を有し、それに続けてクローニングすべき遺伝子の5'もしくは3'末端部の塩基配列をそれぞれ有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用し、該遺伝子を鋳型としてPCRを行って得られるPCR産物をds部末端を有するDNA断片として本発明の方法を適用すると、PCRにより適正な伸長が行われていない副産物は上記環状DNA構成体を形成しないため、コンピテント細胞に導入されない。こうして、本発明の方法によれば、クローニングすべき遺伝子が、PCR法により適正に増幅されたPCR産物のみを取得することができる。

## 【0032】

また、上述の環状DNA構成体は、適当なコンピテント細胞内で自律複製できるので、それら自体またはその複製体を用いて、その中に含まれるDNA配列または遺伝子の構造ないしは機能の解析にも利用できる。したがって、本発明の別の態様として、環状DNA構成体であって、一本鎖部（ss部）末端と一方の鎖が前記ss部の塩基配列に対して相同性の配列を含む二本鎖部（ds部）末端とからなる三本鎖構造部分を少なくとも一箇所有するDNA構成体が提供される。かようなDNA構成体としては、上述の2つのDNA断片から構成されており、



その 1 つの断片がコンピテント細胞内で自律複製できる塩基配列を有し、もう 1 つの断片がクローニングすべき遺伝子の全部または一部を含むものであって、かつ三本鎖構造部分を 2 箇所有するものが好ましい。「遺伝子の一部」は、その遺伝子を他の遺伝子と識別できる塩基配列をもっている限り、そのサイズを問わない。また、遺伝子は 2 種以上の遺伝子が含まれていてもよい。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法は、上述のように遺伝子のクローニングに適用できる。また、かようなクローニングは、さらに別の態様として提供する、下記の遺伝子のクローニング用のキットにより都合よく実施できるであろう。このようなキットは、少なくとも

(A) 一本鎖部 (s s 部) を両末端に有する二本鎖 DNA 断片であって、これらの s s 部における塩基配列が非相補性であり、かつ二本鎖部にコンピテント細胞内で自律複製できる機能を提供しうる DNA 配列が存在する DNA 断片、と

(B) 上記各 s s 部における塩基配列に相同性の配列をそれぞれ 5' 末端の一部として有し、それぞれさらにクローニングすべき遺伝子の片末端の配列の一部ともう一方の片末端の配列の一部を連続した配列として有する 2 種のオリゴヌクレオチドのプライマーとの組み合わせ物を含んでなる遺伝子のクローニング用キットである。

【 0 0 3 4 】

上記の s s 部における塩基配列の長さおよび二本鎖部 (すなわち、コンピテント細胞内で自律複製できるベクターまたはプラスミドに由来) は、既に記述したとおりである。また、クローニングすべき遺伝子の片末端の配列の一部ともう一方の片末端の配列の一部は、該遺伝子を鋳型とし、そしてそれぞれ上記 s s 部と一緒にあって、PCR のプライマーとして機能する長さの配列である。

【 0 0 3 5 】

本発明のキットの一使用態様によれば、(A) の DNA 断片と、(B) のプライマーを用いて増幅された PCR 産物 (d s 部末端を有する DNA 断片に相当する) とにより連結が行われる。上述したように、連結は、相同的組換えタンパク質、ヌクレオシド三リン酸の存在下、適当に緩衝化された水溶液中で行われる。

したがって、上記DNA試料の他に、上記タンパク質、ヌクレオシド三リン酸、緩衝剤を本発明のキットに含めてもよい。さらには、連結して得られたDNA構成体に結合した上記タンパク質を除去するためのプロティナーゼを含めてもよい。

【0036】

以上のような本発明の連結法は、以下のような特徴を有する。

【0037】

(i) 連結すべきDNA断片に適当な制限酵素認識部位が存在していなくても、連結が可能である。

【0038】

(ii) 連結酵素を使用しないので、ベクターDNAの自己連結反応が起こらず、遺伝子のクローニングにおいて望ましくない副産物の混入を避けることができる。

【0039】

(iii) 連結部位は、その後導入されるコンピテント細胞内で修復されるので、必ずしもライゲーションを行う必要がない。

【0040】

(iv) 限定されるものでないが、例えば、PCR産物のクローニングに適用する場合には、PCR副産物はコンピテント細胞内に導入されないので、バックグラウンドが低くなる。

【0041】

(v) 相同的組換えタンパク質（例えば、RecAタンパク質）を使用するために、連結に塩基特異性および方向特異性をもたらすことが可能である。

【0042】

(vi) 形質転換は従来法より同程度以上の効率で行うことができる。

【0043】

(vii) 上述の C. Aslanidis らの方法のように、特別なベクターを使用する必要がないので、汎用性が高い。

【0044】

したがって、本発明は、遺伝子操作を伴う技術分野において、極めて有用である。

【0045】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明する。

【0046】

実施例1： RecAタンパク質を用いるDNA断片のクローニング（モデル実験系）

ベクターDNAとして、直鎖状ベクターDNAの両末端が、13mer（配列A）と14mer（配列B）の3' 突出末端を持つものを用意した。配列Aを5' 末端にもち、それに続いて、ヒトのp53geneのエクソン11の片末端配列をもつオリゴヌクレオチド1と、配列Bを5' 末端にもち、それに続いて、もう一方の末端配列をもつオリゴヌクレオチド2を用いて、ヒトゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、取得した増幅産物をインサートDNA断片として用意した。上記、ベクターDNA断片と、インサートDNA断片との間でRecA組み換え中間体形成（三本鎖構造部形成）反応を行った。この反応には、2つの反応液AとB（それぞれ20 $\mu$ l）を準備した。反応液Aには、200ngインサートDNA断片、6.0 $\mu$ gのRecAタンパク、0.48mM ATP- $\gamma$ S、30mM酢酸トリス（pH7.2）、2.5mM酢酸マグネシウムが含まれている。反応液Bには、1 $\mu$ gのベクターDNA断片、0.48mM ATP- $\gamma$ Sを、30mM酢酸トリス（pH7.2）、2.15mM酢酸マグネシウムが含まれている。反応液AとBを、それぞれ37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。0.5%（W/Vo1）SDS、0.7mg/mlプロテイナーゼKを加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした後、60 $\mu$ lのTE緩衝液10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)を加え、100 $\mu$ lとした。フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10 $\mu$ lの蒸留水に溶かした。これらの適量を、エレクトロポレーションの常法により大腸菌株DH10Bに形質転換した

。アンピシリン、IPTG、X-Gal を含む寒天培地で 1 晩培養し、生じてきたインサートを含む白いコロニーから、プラスミドを調製し、それに含まれるインサート DNA を調べた。制限酵素 BamHI の認識部位が、インサート DNA のほぼ中央とベクター DNA のインサートを組込み部位の近傍にあることを確認した。次いで、BamHI を使ってインサート DNA を切り出すと同時に、インサート DNA が目的とするものであるかどうかを確認するためにアガロースゲル電気泳動による DNA 断片の泳動パターンの解析を行った。結果を図 2 に示す。この図のレーン 1 からレーン 5 は、培養の結果生じた白色コロニーから調製したプラスミドに由来するものを示し、そしてレーン 6 からレーン 7 は、培養によって出てきた青色コロニーから調製したプラスミドに由来するものである。レーン 8 は、用いたベクター DNA に由来する。レーン M は、DNA サイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、λ DNA を制限酵素 Hind III で切断したものである。

【0047】

図から、約 600 bp のところに切り出されたインサート DNA のバンドがみられ、ベクター DNA にもインサート DNA の一部が方向性をもって連結されたことがわかる。また、インサートを含まない青色コロニーのプラスミドは、インサートを含まないことがわかる。

オリゴヌクレオチド 1 (配列番号: 1)

5' -gacgacgacaaga c acctgaagtc caaaaagggt cagtc-3'

オリゴヌクレオチド 2 (配列番号: 2)

5' -gaggagaagcccgg tggcag caaagtttta ttgtaaaata-3'

(上記配列において、それぞれ 14 番目の C 以降および 15 番目の t 以降がヒトゲノム DNA の配列に相当する。)

実施例 2 : 連結された DNA の確認

図 3 のレーン 1 は、実施例 1 で大腸菌に形質転換する前の DNA 混合物を、1.0% アガロースゲル電気泳動したものである。レーン 2 は、実施例 1 に記載したインサート DNA が、配列 A はもつが、配列 B を片側末端に含まないものを使って反応を行った DNA 混合物であって、大腸菌に形質転換する前の DNA 混合

物を同様に電気泳動したものである。レーン3は、実施例1に記載したインサートDNAが、配列Bはもつが、配列Aを片側末端に含まないものを使って反応を行ったDNA混合物であって、大腸菌に形質転換する前のDNA混合物を同様に電気泳動したものである。レーン4は、実施例1に記載したインサートDNAが、配列Aと配列Bともそれぞれの末端に含まないもの（それぞれ、オリゴヌクレオチド3および4）を使って反応を行ったDNA混合物であって、大腸菌に形質転換する前のDNA混合物を同様に電気泳動したものである。レーン5は、レーン1で用いたインサートDNAのみを電気泳動した結果である。レーン6は、レーン2で用いたインサートDNAのみを電気泳動した結果である。レーン7は、レーン3で用いたインサートDNAのみを電気泳動した結果である。レーン8は、レーン4で用いたインサートDNAのみを電気泳動した結果である。レーン9は、用いたベクターDNAである。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 $\lambda$  DNAを制限酵素Hind IIIで切断したものである。

## 【0048】

図より、RecAの反応により、配列特異的にDNA断片が連結されることがわかる。

オリゴヌクレオチド3（配列番号：3）

5' -c acctgaagtc caaaaagggt cagtc-3'

オリゴヌクレオチド4（配列番号：4）

5' -tggcag caaagtttta ttgtaaaata-3'

実施例3：連結反応の酵素依存性

図4のレーン1は、実施例1で大腸菌に形質転換する前のDNA混合物を、1.0%アガロースゲル電気泳動したものである。レーン2は、ATP- $\gamma$ Sを加えないでレーン1と同じ反応を行った結果を示す。レーン3は、RecAを加えないでレーン1と同じ反応を行った結果を示す。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 $\lambda$  DNAを制限酵素Hind IIIで切断したものである。

## 【0049】

図より、目的DNA断片の連結には、RecAによる酵素反応が必要不可欠である。

#### 【0050】

##### 実施例4：連結したDNAの、安定性を調べる実験

三本鎖構造の形成を介して連結したDNAの安定性を調べた。必要に応じて、連結したDNAを大腸菌に形質転換する前に、各種DNA修飾酵素で処理することが可能であるかどうか調べた。ここで調べたのは修飾酵素の1つである、耐熱性DNAライゲース（アンプリガーゼ）について調べた。その具体的な反応は、実施例1で記載した反応で、反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした後、その反応液に等量のライゲーション反応混合溶液を混ぜ、55℃で1時間インキュベートした。ライゲーション反応液の組成は、40mM Tris-HCl、50mM KCl、20mM MgCl<sub>2</sub>、1.0mM NAD、0.02% Triton X-100、pH8.3、40unitsアンプリガーゼ（Ampligase）である。次に、0.5%（W/Vol）SDS、0.7mg/mlプロテイナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートした後、20μlのTE緩衝液（10mM Tris-HCl、1mM EDTA）を加え、100μlとした。フェノール・クロロホルム抽出を1回、クロロホルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10μlの蒸留水に溶かした。その適量について1.0%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後に、エチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を取りDNAを観察した。図5のレーン1が、その結果を示す。レーン2は、アンプリガーゼを加えないでレーン1と同じ反応を行った結果を示す。レーン3は、ライゲーション反応を上記反応液の代わりに、蒸留水を用いたことと、ライゲーションのインキュベーションを行わないで、レーン1と同じ反応を行った結果を示す。レーン4は、インサートDNAを示す。レーン5は、ベクターDNAを示す。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、λDNAを制限酵素HindIIIで切断したものである。

#### 【0051】

図より、連結されたDNAサンプルを、アンプリガーゼ反応緩衝液中で、55℃で1時間インキュベートしても、電気泳動ゲルでのバンドパターンには大きな変化は見られなかった。レーン2およびレーン3の結果から、本発明によってできるDNA複合体は、非常に安定であることがわかる。このことから、必要ならば、RecAタンパクの存在下で、DNAリガーゼによるライゲーションを行うことが可能である。これは、インサートDNAを共有結合でベクターDNAに組み込むことが可能になり、また、DNAに入っているニックを修復することも可能である。また、他の耐熱性DNA修復酵素を用いてあらゆる連結DNA複合体の修飾も可能である。

#### 【0052】

##### 実施例5：三本鎖構造形成反応における、各反応成分の依存性

ターゲットDNAとしてM13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで直鎖状にしたものと、そのターゲットDNAの末端部位の配列を持つ60-merのオリゴヌクレオチド5を用意した。このオリゴヌクレオチドは、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPで5'末端を標識した。ターゲットDNAとオリゴヌクレオチド3との間の三本鎖構造形成反応には、2つの反応液A (20  $\mu$ l) と反応液B (20  $\mu$ l) を準備した。反応液Aには、1 pmolの標識オリゴヌクレオチド5、6.0  $\mu$ gのRecAタンパク、0.48 mM ATP- $\gamma$ S、30 mM酢酸トリス (pH 7.2)、2.5 mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、200 ngのターゲットDNA、0.48 mM ATP- $\gamma$ Sを、30 mM酢酸トリス (pH 7.2)、2.15 mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。この時点での三本鎖構造形成反応を終えた反応液40  $\mu$ lに、0.5% (W/Vol) SDS、0.7 mg/mlプロテイナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除RecA処理を行った。その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。結果を図6 (B) に示す。その後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。その

結果を図6 (A) のレーン1に示す。比較実験として、次のことを行った。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 $\lambda$  DNAを制限酵素HindIIIで切断し、 $[\gamma-^{32}\text{P}] \text{ATP}$ で5'末端標識したものである。レーン2は、RecAを加えないで反応を行った以外は、レーン1と同じである。レーン3は、 $\text{ATP}-\gamma\text{S}$ を加えないで反応を行った以外は、レーン1と同じである。レーン4は、逆相補オリゴヌクレオチド6を用いて反応を行った以外はレーン1と同じである。レーン5は、オリゴヌクレオチドを加えないで反応を行った以外はレーン1と同じである。レーン6は、オリゴヌクレオチド7を用いて反応を行った以外はレーン1と同じである。レーン7は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したターゲットDNAに対するオリゴヌクレオチド7を用いて、反応を行ったサンプル。レーン7は、ターゲットDNAとして、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したものをを用いたことと、その末端部位の配列をもつ標識オリゴヌクレオチド7を用いたこと以外は、レーン1と同じ反応を行ったものである。

## 【0053】

図より、(A) のレーン1に示すように、三本鎖構造形成には、全ての反応成分が反応に加えられる必要があることがわかる。また、逆相補オリゴヌクレオチドと逆相同オリゴヌクレオチドでは、三本鎖構造形成体は得られないことから、オリゴヌクレオチドの方向性は一方のみである。

オリゴヌクレオチド5 (配列番号: 5)

5' -agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac-  
3'

オリゴヌクレオチド6 (配列番号: 6)

5' -gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtcct caaagcctct-  
3'

オリゴヌクレオチド7 (配列番号: 7)

5' -cact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg  
gtgagt-3'

実施例6: 三本鎖構造形成反応における、用いるオリゴヌクレオチドの配列方



## 向性

図 7 (A) のレーン 1 は、図 1 3 (A) のレーン 1 と同じ反応を行ったものである。レーン 2 は、逆相補な配列をもつ標識オリゴヌクレオチド 4 を用いた以外は、レーン 1 と同じ反応を行ったものである。レーン 3 は、標識オリゴヌクレオチド 8 を用いた以外は、レーン 1 と同じ反応を行ったものである。レーン 4 は、標識オリゴヌクレオチド 9 を用いた以外は、レーン 1 と同じ反応を行ったものである。(B) は (A) と同じアガロースゲルの、DNA 全染色写真。

【0 0 5 4】

図より、直鎖状ターゲット DNA の両末端部位で三本鎖形成が可能であり、そのとき用いるオリゴヌクレオチドは、ターゲットの両末端配列の一方の方向を持った相同配列でなければならない。

オリゴヌクレオチド 8 (配列番号: 8)

5' -tgtttttagtg tattctttcg cctctttcgt ttttaggttgg tgccttcgta  
gtggcattac-3'

オリゴヌクレオチド 9 (配列番号: 9)

5' -gtaatgccac tacgaaggca ccaacctaaa acgaaagagg cgaaagaata  
cactaaaaca-3'

実施例 7: 三本鎖構造形成反応における、オリゴヌクレオチド配列の熱安定性

図 8 (A) のレーン 1 と同じ反応を行ったサンプル 1 0  $\mu$  l に 2 0 mM NaCl を加えて、熱処理 (3 7℃、1 0 分) を行ったサンプル。レーン 2 は、熱処理 (4 5℃、1 0 分) のサンプル。レーン 3 は、熱処理 (5 5℃、1 0 分) のサンプル。レーン 4 は、熱処理 (6 5℃、1 0 分) のサンプル。レーン 5 は、熱処理 (7 5℃、1 0 分) のサンプル。レーン 6 は、熱処理 (8 5℃、1 0 分) のサンプル。(B) は (A) と同じアガロースゲルの、DNA 全染色写真。(C) は、(A) と同じ実験を、M 1 3 m p 1 8 R F DNA を制限酵素 S n a B I で切断したターゲット DNA の末端領域の配列を持つ、4 0 - m e r の長さのオリゴヌクレオチド 1 0 を用いて行った。(D) は (C) と同じアガロースゲルの、DNA 全染色写真。

オリゴヌクレオチド 1 0 (配列番号: 1 0)

5' -actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac-3'

図より、60-mer のオリゴヌクレオチド5を用いた三本鎖の熱安定性は、85℃付近がほぼ限界で、40-mer のオリゴヌクレオチドを用いた場合には、75℃付近がほぼ限界であることがわかる。オリゴの長さが60-mer 以上であると、三本鎖の熱安定性は、極めて高いことがわかる。

【0055】

実施例8：RecA反応による、長鎖cDNA断片のクローニング

ベクターDNAとして、プラスミド pBluescript (SK+) を制限酵素 NotI と SalI で切断したものを、さらに、キロシーケンス用ディリジョンキット (タカラ酒造社) を用いて、両端を5' 突出末端化した。その方法は、制限酵素 NotI と SalI で5' 突出末端化したベクターDNA 300 ng を含むエキソヌクレアーゼ反応液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 180 unit Exonuclease III) 100 μl を、37℃で1分間反応させた。フェノール・クロロフォルム抽出・エタノール沈殿を行い、酵素の失活とDNAの濃縮を行った。また、インサートDNAとして、7 kb の長さをもつラットcDNA断片 (Ohara, O. et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 57(2) 181-192(1998)参照; GenBank の accession no. AB008551) を用いた。このcDNA断片の両末端には、それぞれ54 bp と55 bp の長さの、ベクターDNAの末端領域とオーバーラップした配列を持っている。上記、ベクターDNAと、インサートDNAとの間でRecA組み換え中間体形成 (三本鎖構造形成) 反応を行った。三本鎖構造形成反応は、2つの反応液AとB (それぞれ20 μl) を準備した。反応液Aには、200 ng インサートDNA、6.0 μg のRecAタンパク、0.48 mM ATP-γS、30 mM 酢酸トリス (pH 7.2)、2.5 mM 酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、1 μg のターゲットDNA、0.48 mM ATP-γSを、30 mM 酢酸トリス (pH 7.2)、2.15 mM 酢酸マグネシウムが含まれる。反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。0.5% (W/Vol) SDS、0.7 mg/ml プロテイナーゼKを加え、37℃で15分間インキュベートし

た後、 $60\mu\text{l}$ のTE緩衝液（ $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $1\text{mM EDTA}$ ）を加え、 $100\mu\text{l}$ とした。フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を $10\mu\text{l}$ の蒸留水に溶かした。その適量を、 $1.0\%$ アガロースゲル電気泳動した結果を、図9のレーン1に示す。レーンMは、 $\text{kb DNA ladder maker}$ を示す。レーン2は、エキソヌクレアーゼ反応を2分間行ったこと以外はレーン1と同じ反応を行った結果を示す。

【0056】

図より、Exo-処理ベクターとインサートに対するRecA反応で複合体形成がみられる。exo-処理は1分でも2分でも問題ない。本鎖化された領域の長さは直接は測定していないが、1分当たり $100-200$ 塩基程度だろうと推定される。

【0057】

実施例9：連結したDNAの修復反応。

【0058】

実施例1で記載した反応で、電気泳動する前のサンプルを、 $\text{T4 DNA Polymerase}$  反応液と、クレノウ反応液に混ぜ、 $37^\circ\text{C}$ で15分間反応させた。 $\text{T4 DNA Polymerase}$  反応液には、 $0.25\text{mM dNTPs}$ 、 $33\text{mM Tris-acetate}$ 、 $\text{pH } 7$ 、 $66\text{mM CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 、 $10\text{mM (CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Mg}$ 、 $0.5\text{mM DTT}$ 、 $0.01\%$  BSA、 $4\text{unit T4 DNA Polymerase}$ を含む。反応後に、 $20\mu\text{l}$ のTE緩衝液（ $10\text{mM Tris-HCl}$ 、 $1\text{mM EDTA}$ ）を加え、 $100\mu\text{l}$ とした。フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を $10\mu\text{l}$ の蒸留水に溶かした。その適量について $1.0\%$ アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後に、エチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を取りDNAを観察した。図10のレーン1は、反応を行う前のDNAを示す。レーン2は、 $\text{T4 DNA Polymerase}$ で反応させた結果を示す。レーンMは、 $\text{kb DNA ladder maker}$ を示す。

【0059】

図より、T4 pol.処理で6 kb付近の同定のバンドは消失するが、10 kb付近のベクター／インサート複合体らしきバンドはなくなる。

【0060】

実施例10：連結されたDNAの確認

結果を図11に示す。レーンMは、kb DNA ladder makerを示す。図10のレーン1と同じサンプルを、大腸菌株DH10Bに形質転換した。アンピシリン、IPTG、X-Galを含む寒天培地で1晩培養し、プレート上の500クローンからプラスミドを回収して、アガロースゲル電気泳動した。その結果をレーン1に示す。レーン2は、図10のレーン2と同じサンプルについてレーン1と同じ処理を行った結果を示す。レーン3は、図10のレーン3と同じサンプルについてレーン1と同じ処理を行った結果を示す。

【0061】

図より、T4 pol.処理を行っても、DNA断片はクローニングされている。

【0062】

実施例11：

DNA連結複合体のエンドヌクレアーゼ処理の効果

連結したDNA（部分的に三本鎖構造を有する）を大腸菌に形質転換する前に、各種エンドヌクレアーゼ処理を行い、その後の形質転換効率の変動を調べた。実施例1で示した方法により、三本鎖構造の形成によって連結させたDNA複合体を、実験1：Cleavase(R)VII (Third Wave Technologies, inc.) 反応（反応液組成未公表に混ぜ、全量20  $\mu$  lとし、54度60分インキュベーション）実験2：マングビーンヌクレアーゼ反応（30 units Mung Bean Nuclease（宝酒造社）、30 mM酢酸ナトリウム（pH5.0）、100 mM NaCl、1 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn、5%グリセロールを含むS1ヌクレアーゼ反応液に混ぜ、全量20  $\mu$  lとし、37度30分インキュベーション、実験3：S1ヌクレアーゼ反応（10 units S1 Nuclease（宝酒造社）、30 mM酢酸ナトリウム（pH4.6）、280 mM NaCl、1 mM ZnSO<sub>4</sub>、を含むS1ヌクレアーゼ反応液に混ぜ、全量20  $\mu$  lとし、37度で10分間インキュベーション）、

実験4: BAL31ヌクレアーゼ反応 (10 units BAL31 Nuclease (宝酒造社)、20mM Tris-HCl (pH8.0)、600mM NaCl、12mM CaCl<sub>2</sub>、12mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、を含むBAL31 Nuclease 反応液に混ぜ、全量20 $\mu$ lとし、20℃で30分間インキュベーション)、実験5: 処理なし。DNA連結複合体を、以上の各種酵素で反応後に、80 $\mu$ lのTE緩衝液 (10mM Tris-HCl、1mM EDTA) を加え、100 $\mu$ lとした。フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10 $\mu$ lの蒸留水に溶かした。その適量を、大腸菌株DH10Bに形質転換した。アンピシリン、IPTG、X-Galを含む寒天培地で1晩培養し、出てきたインサートを含む白いコロニー数を数えた。

【0063】

その結果を、下記表1に示す。

【0064】

【表1】

表1:

実験番号	1	2	3	4	5
大腸菌白色コロニー数	335	206	153	164	82

表1より、形質転換前のエンドヌクレアーゼ処理は、本発明に従うDNA構成体による形質転換効率を向上させることが確認できる。

【0065】

【配列表】

<110> Aisin Seiki Co., LTD.  
 <120> 二本鎖DNA断片の末端での連結  
 <130> 9907003  
 <160> 10  
 <210> 1  
 <211> 39

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > T を含まないランダムな配列 1 3 m e r と、それに続く、ヒトゲノム DNA 中の p 5 3 gene のエクソン 1 1 領域の片側端の配列を参考にして合成

< 4 0 0 > 1

gacgacgaca agacacctga agtcctcaaaaa gggtcagtc

39

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 4 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > T を含まないランダムな配列 1 4 m e r と、それに続く、ヒトゲノム DNA 中の p 5 3 gene のエクソン 1 1 領域の片側端の配列を参考にして合成

< 4 0 0 > 2

gaggagaagc ccggtggcag caaagtttta ttgtaaaata

40

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2 6

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > ヒトゲノム DNA 中の p 5 3 gene のエクソン 1 1 領域の片側端の配列を参考にして合成

< 4 0 0 > 3

cacctgaagt ccaaaaaggg tcagtc

26

< 2 1 0 > 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒトゲノムDNA中の p 53 gene のエクソン 11 領域の片側端の  
配列を参考にして合成

<400> 4

tggcagcaaa gttttattgt aaaata

26

<210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13mp18RFの、SnaBI 認識部位に近接したヌクレオチ  
ド配列を参考にして合成

<400> 5

agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 60

<210> 6

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13mp18RFの、SnaBI 認識部位に近接したヌクレオチ  
ド配列を参考にして合成

<400> 6

gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtcct caaagcctct 60

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pBR322の、ScaI 認識部位に近接したヌクレオチド配列を  
参考に合成

<400> 7

cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 60

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13mp18RFの、SnaBI 認識部位に近接したヌクレオチ  
ド配列を参考に合成

<400> 8

tgtttagtg tattctttcg cctctttcgt tttaggttgg tgccttcgta gtggcattac 60

<210> 9

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13mp18RFの、SnaBI 認識部位に近接したヌクレオチ  
ド配列を参考に合成

<400> 9

gtaatgccac tacgaaggca ccaacctaaa acgaaagagg cgaaagaata cactaaaaca 60



<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13mp18RFをSnaBIで切断して得られるDNA断片の  
末端領域の配列を参考にして合成

<400> 10

actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

recA三本鎖形成反応による、DNA断片のクローニング法の反応模式図を示す。

【図2】

recA三本鎖形成反応による、DNA断片のクローニングを行った実施例1のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図3】

recA三本鎖形成反応による、連結されたDNAの確認を行った実施例2のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図4】

recA三本鎖形成によって連結されたDNA断片の連結反応の酵素依存性について調べた実施例3のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図5】

recA三本鎖形成によって連結された連結したDNAの、熱安定性を調べた実施例4のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図6】

オリゴヌクレオチドを用いたDNA末端型三本鎖形成反応における、各反応成分の依存性を調べた実施例5のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真であ

る。

【図 7】

オリゴヌクレオチドを用いた DNA 末端型三本鎖形成反応における、オリゴヌクレオチドの配列方向性を調べた実施例 6 のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図 8】

DNA 末端型三本鎖形成反応における、オリゴヌクレオチド配列の熱安定性を調べた実施例 7 のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図 9】

recA 三本鎖形成反応による、長鎖 cDNA 断片のクローニングを行った実施例 8 のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

【図 10】

recA 三本鎖形成反応による、連結長鎖 cDNA 複合体の修飾酵素を用いた修復反応による効果について調べた実施例 9 のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

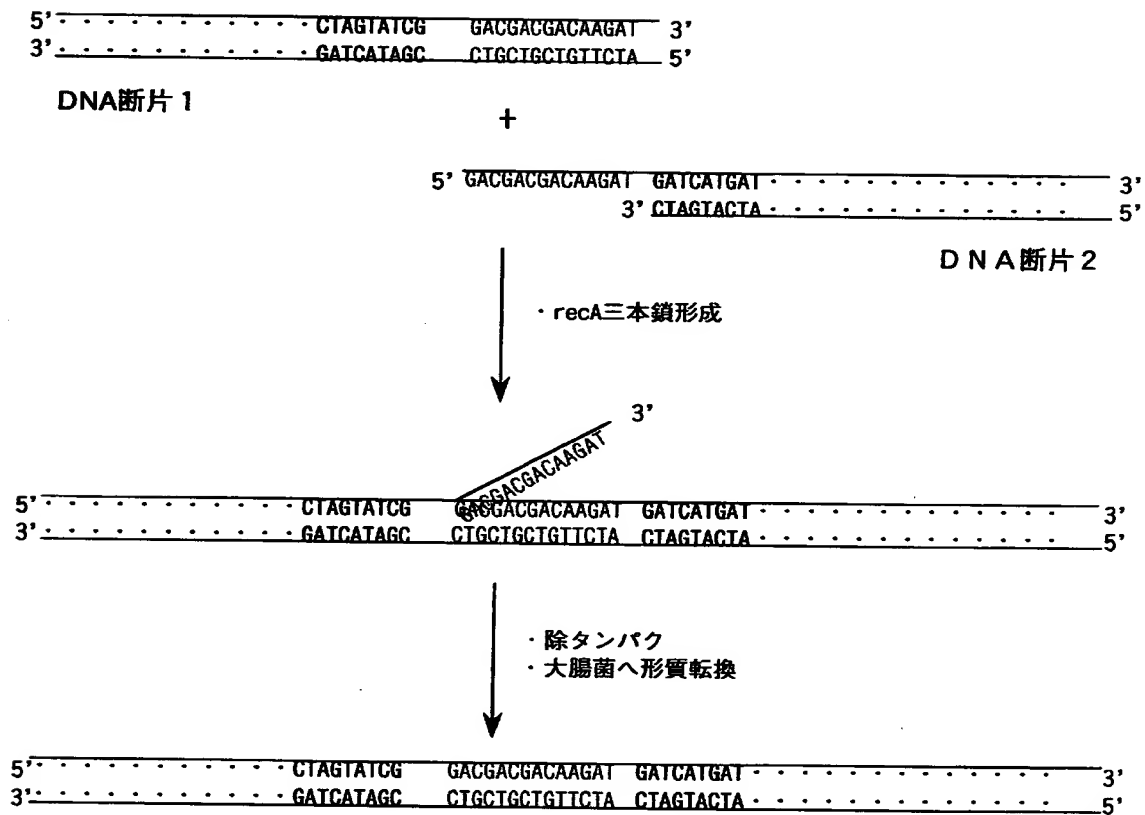
【図 11】

recA 三本鎖形成反応による、連結された長鎖 cDNA 断片の確認を行った実施例 10 のゲル電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

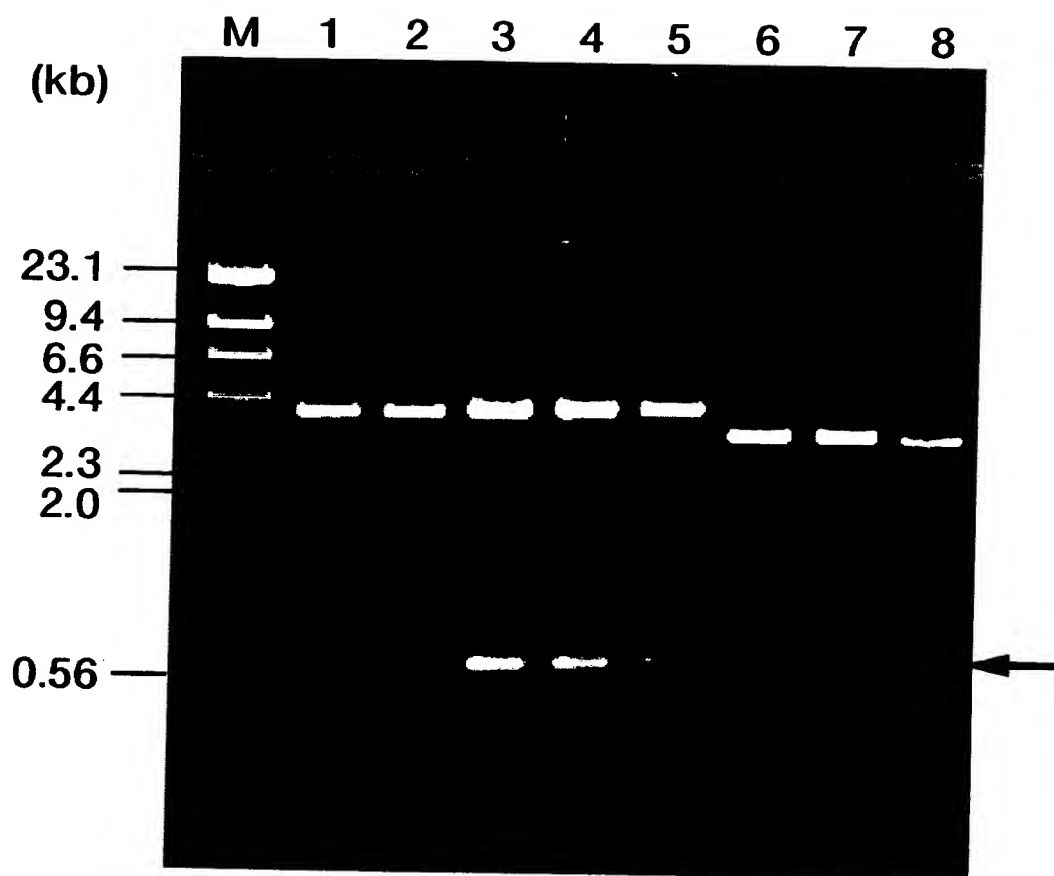
【書類名】 図面

【図 1】

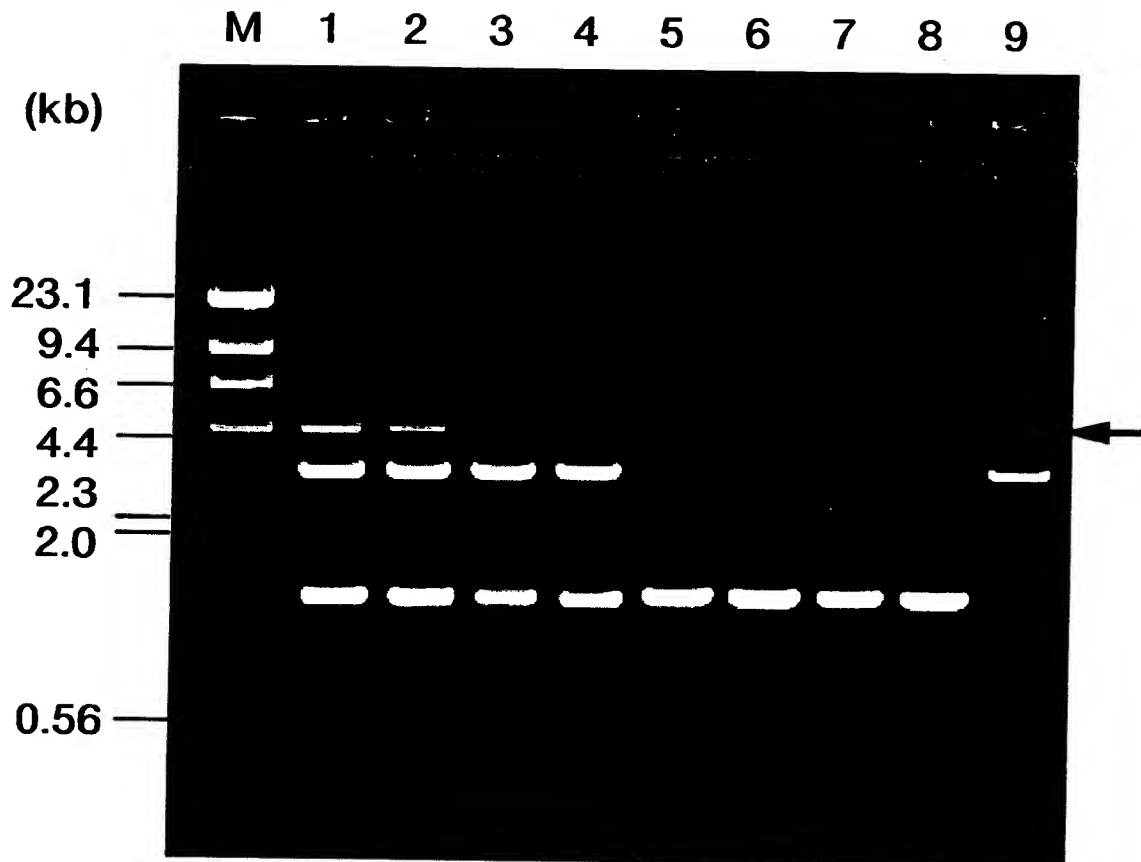
反応の模式図



【図 2】



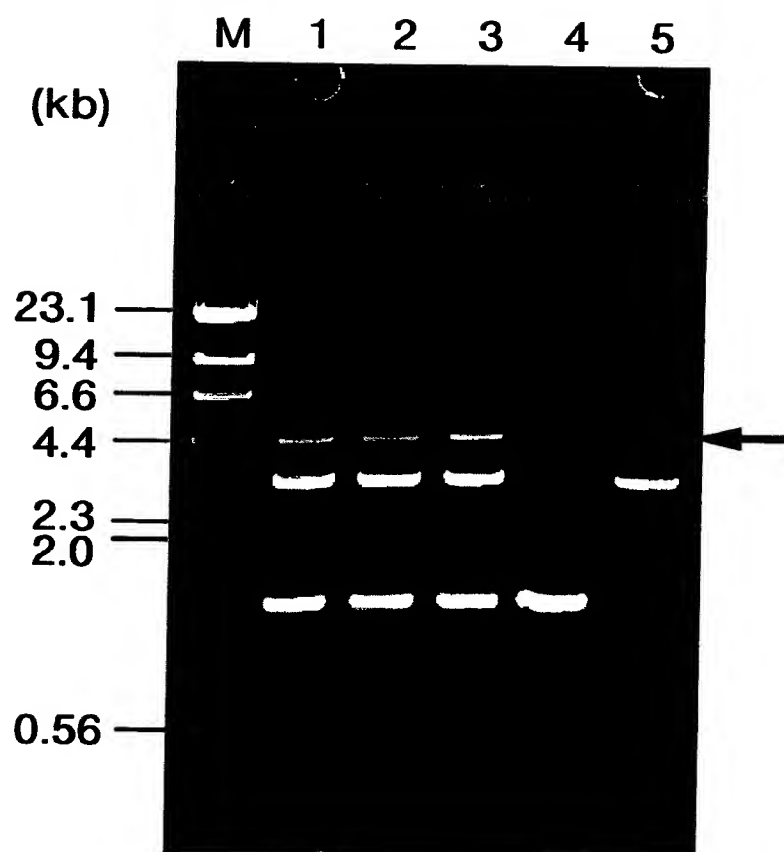
【図 3】



【図 4】

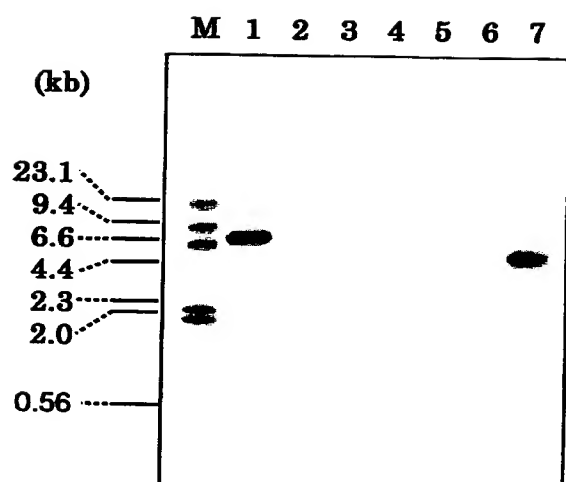


【図 5】

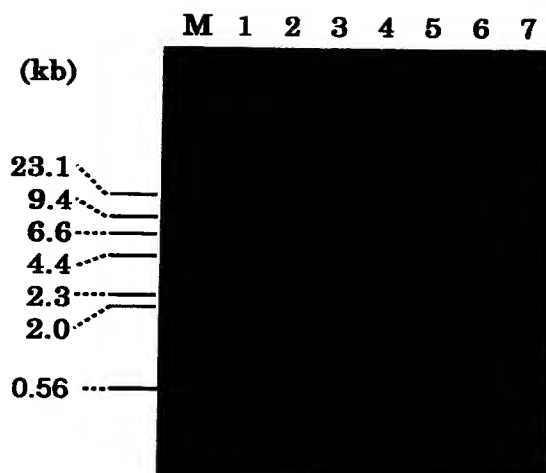


【図 6】

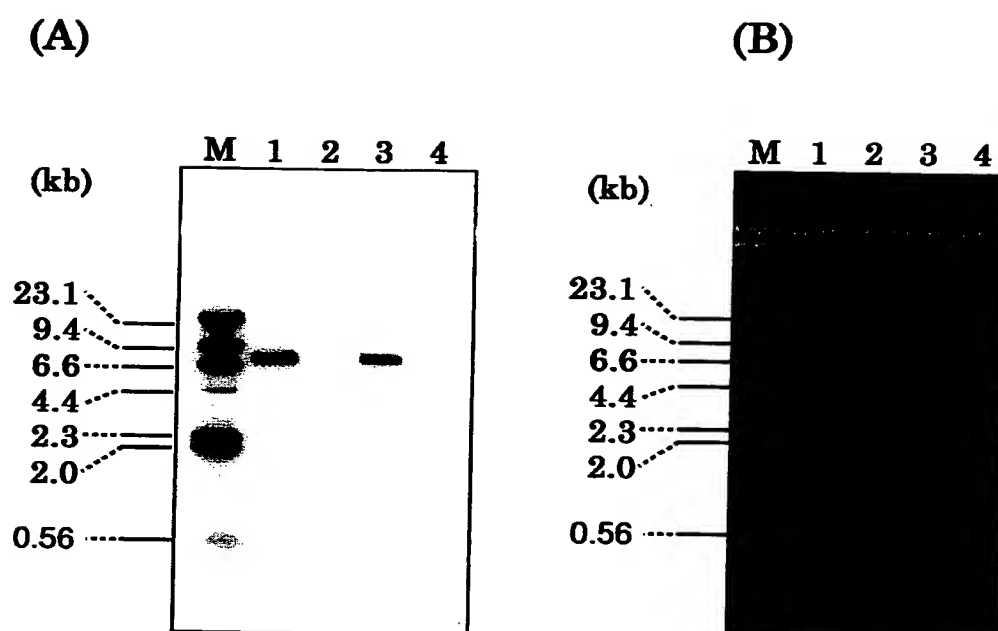
(A)



(B)



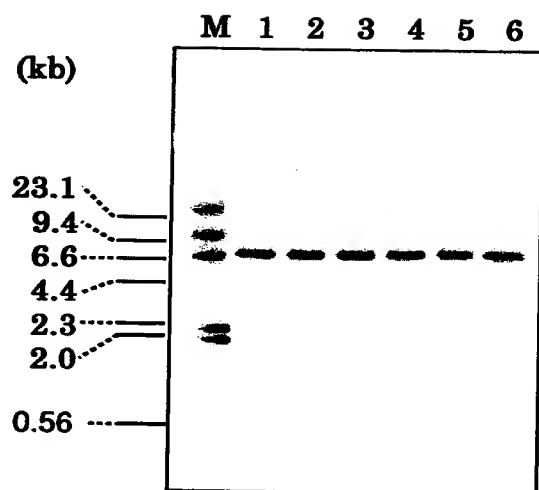
【図 7】



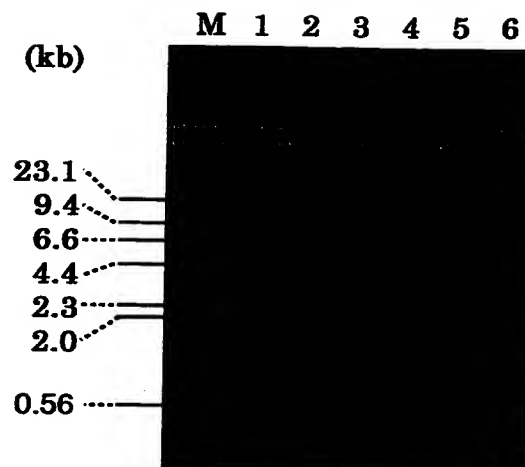


【図 8】

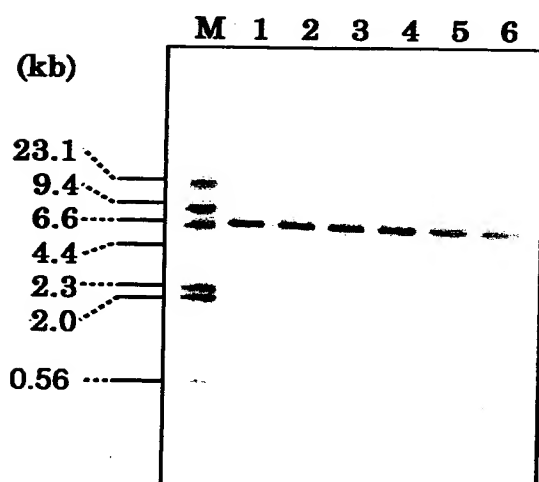
(A)



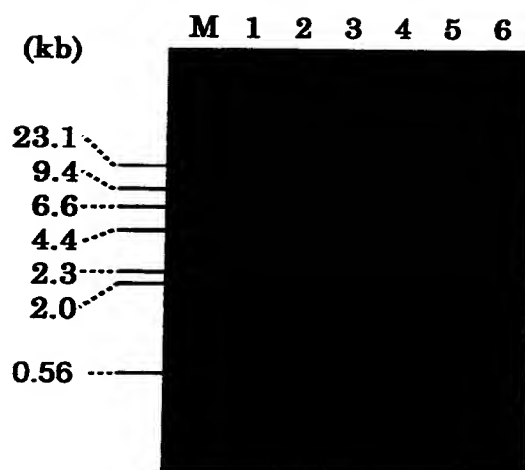
(B)



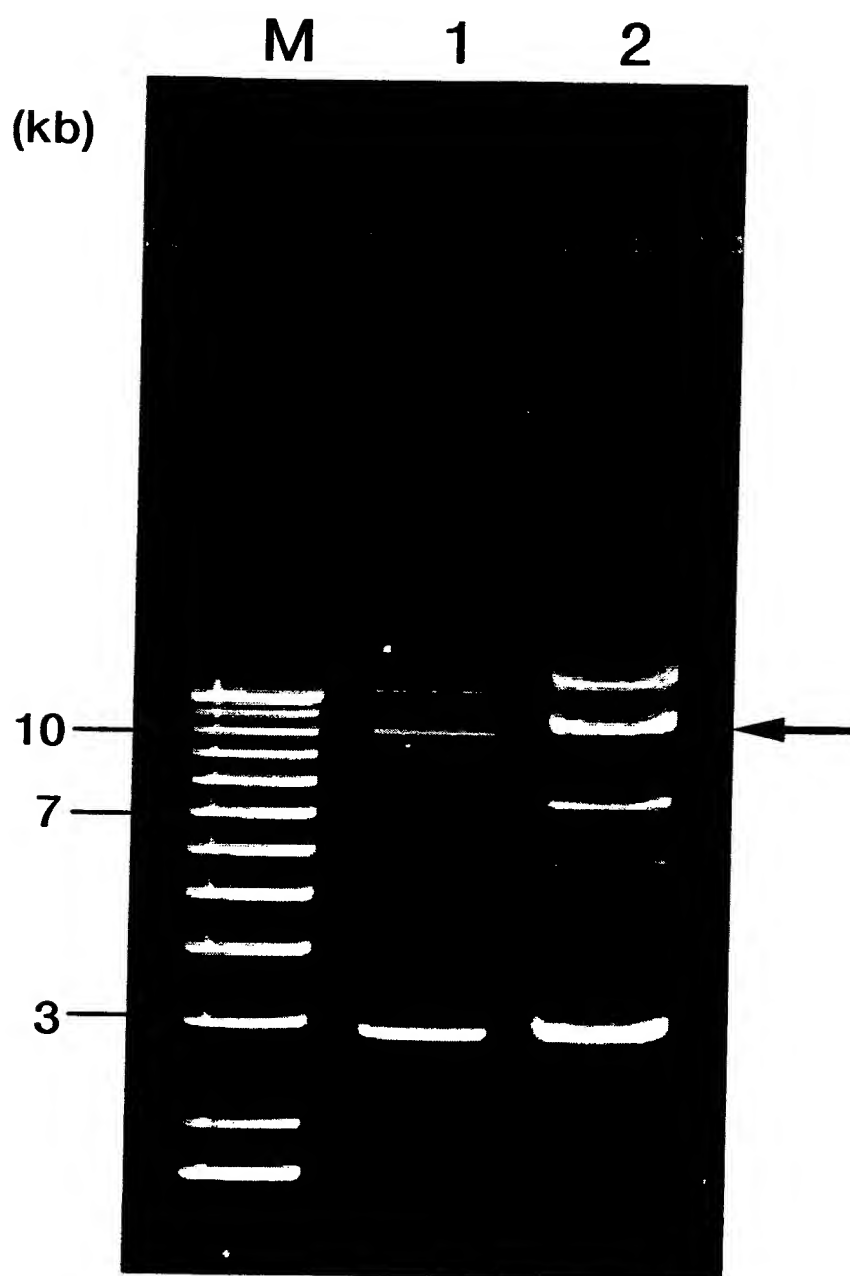
(C)



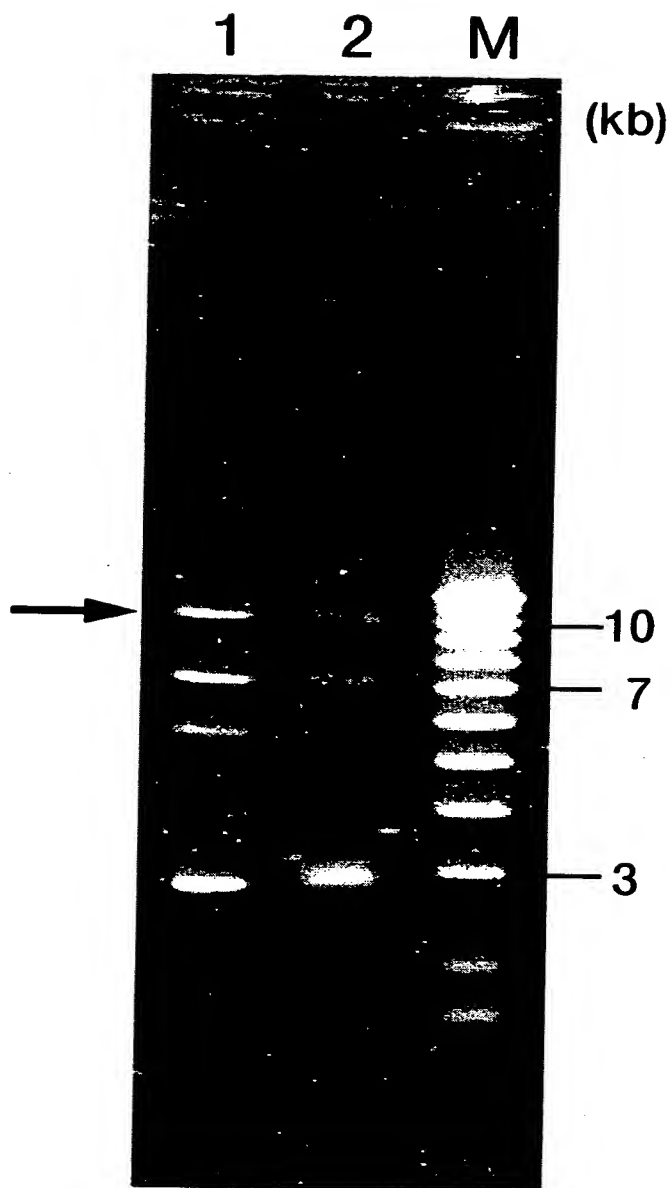
(D)



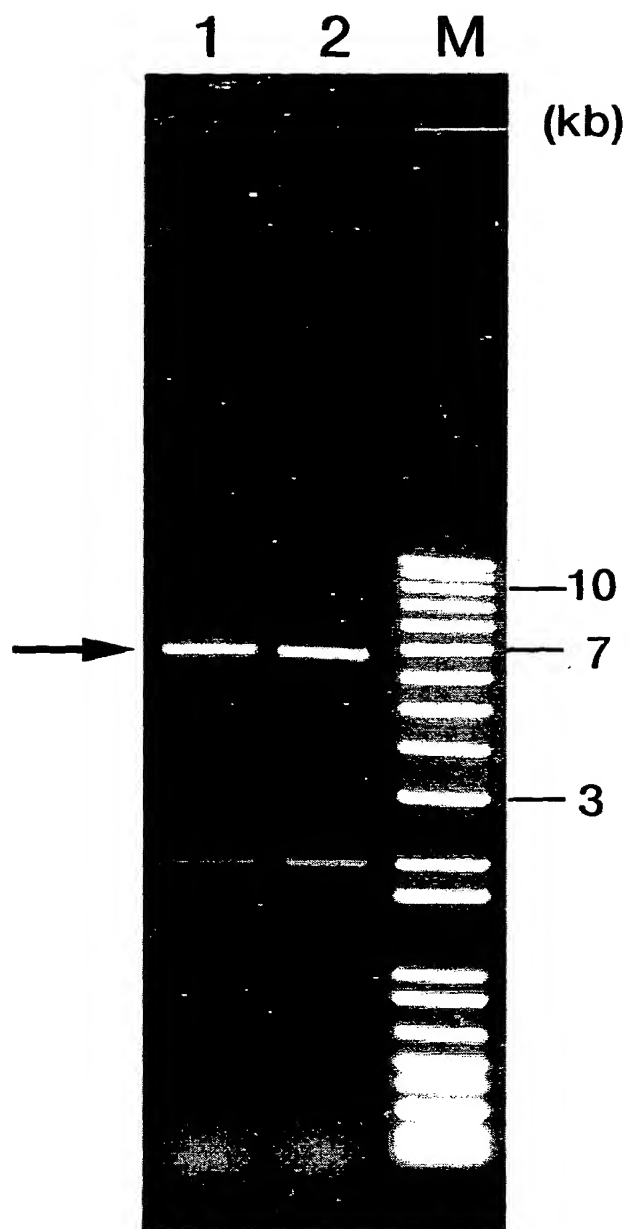
【図 9】



【図 1 0】



【図 1 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNA断片の連結法に関する。

【解決手段】 相同的組換えタンパク質の存在下で末端に一本鎖部を有する二本鎖DNAと末端に一本鎖部をもたない二本鎖DNAのそれぞれの末端において三本鎖構造を有するDNA複合体を形成する。さらに、必要により、得られたDNA複合体を宿主細胞に導入し、該細胞を培養する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第189211号
受付番号	59900638690
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年 7月 6日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000000011
【住所又は居所】	愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地
【氏名又は名称】	アイシン精機株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】	100060782
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内
【氏名又は名称】	小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】	100094293
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所
【氏名又は名称】	藤井 幸喜

【選任した代理人】

【識別番号】	100103311
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館
【氏名又は名称】	小田嶋 平吾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 0 1 1]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 8 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地  
氏 名 アイシン精機株式会社